

苏云金芽胞杆菌产苏云金素菌株 CT-43 及其 缺失突变株的差异蛋白

郭承亮, 胡振飞, 刘晓艳, 余子全, 阮丽芳, 孙明*, 喻子牛*

(华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 微生物农药国家工程研究中心, 武汉 430070)

摘要: 【目的】苏云金素(*Thuringiensin*)的合成和代谢途径的相关研究在国内外一直进展缓慢, 本文拟从蛋白质组水平揭示与苏云金素合成或代谢相关的蛋白。【方法】利用双向电泳技术研究了高产苏云金素的苏云金芽胞杆菌野生菌株 CT-43、其高产突变菌株 CT-43-1C 及不产突变菌株 BMB0806 在蛋白表达水平的差异, 然后对差异蛋白点进行质谱鉴定, 最后对鉴定出的蛋白进行生物信息学分析。

【结果】与野生型和高产菌株相比, 在 BMB0806 中发现了 13 个差异显著的蛋白点, 鉴定出了其中的 9 个, 生物信息学结果显示有 6 个蛋白可能与苏云金素合成或代谢相关。【结论】通过蛋白质组研究找到了 6 个可能与苏云金素合成或代谢相关的蛋白, 为苏云金素合成基因簇的克隆和合成途径的验证提供了有力的证据。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; 苏云金素; 蛋白质组学; 差异蛋白

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0970-05

苏云金素是苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 产生的一种小分子量的核苷类杀虫活性物质, 具有广谱、低毒、稳定性好、降解慢等特点^[1]。它是 DNA 依赖性的 RNA 聚合酶抑制剂, 同 ATP 竞争酶的结合位点。目前, 有关苏云金素编码基因及其生化合成代谢途径的研究进展缓慢, 仅仅克隆了几个与苏云金素向细胞外转运、细胞自身对苏云金素免疫相关以及能够调控苏云金素大量分泌的相关基因^[2, 3]。此外, 还有研究表明苏云金素的产生和苏云金芽胞杆菌内生质粒相关^[4-6], 而直接编码苏云金素合成的基因簇的克隆工作以及负责苏云金素的生化合成途径的验证工作目前在国内外都未有报道。

为了研究影响苏云金素的生化合成途径中的重要作用因子, 本室前期工作获得了苏云金素高产菌株 CT-43 的高产突变菌株 CT-43-1C 和不产苏云金素的突变菌株 BMB0806^[7, 8]。本文利用双向电泳技术研究

了 CT-43 和 CT-43-1C 菌株与 BMB0806 在蛋白质表达水平上的差异, 以期获得苏云金素合成或代谢相关蛋白的相关信息。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株以及菌株的培养条件: 野生型菌株 CT-43, 中华亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *chinensis*), 高产苏云金素; 菌株 CT-43-1C 是 CT-43 的型突变株, 保持高产苏云金素表型; 无晶体突变菌株 BMB0806 是突变菌株 CT-43-1C 的突变株, 不产苏云金素。以上菌株都在本实验室保存^[7, 8]。苏云金芽胞杆菌培养均在同样的条件下培养, 参见文献^[7]。

1.1.2 主要试剂和仪器: IPG 干胶条 (pH 4-7 NL, 18 cm)、IPG 缓冲液 (pH 4-7 NL)、矿物油、尿素 (Urea), CHAPS、二硫苏糖醇 (DTT)、丙烯酰胺、硫脲、过

基金项目: 国家自然科学基金(30400003)

*通讯作者。Tel: +86-27-87283455; Fax: +86-27-87280670; E-mail: yz41@mail.hzau.edu.cn; m98sun@mail.hzau.edu.cn

作者简介: 郭承亮(1982-), 男, 湖北黄冈人, 硕士研究生。主要从事芽胞杆菌蛋白质组学研究。E-mail: guochl19821218@webmail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2008-01-24; 修回日期: 2008-04-02

硫酸铵、四甲基乙二胺 (TEMED)、PMSF、碘乙酰胺、SDS 和 Tris 等均为 Amersham Biosciences 公司产品;牛血清白蛋白 (BSA)、碳酸钠、硫代硫酸钠等为 Sigma 公司产品,其他试剂为国产分析纯试剂,所有试剂均用去离子水配制。

1.2 用作双向电泳的苏云金芽胞杆菌样品制备及定量
收集培养好的苏云金芽胞杆菌菌体用细胞洗涤液(10 mmol/L Tris、250 mmol/L 山梨醇, pH 7.0)洗涤 3 次,加入灭菌的研钵中用液氮研磨充分;再加入适量的裂解液(7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、65 mmol/L DTT、1 mmol/L PMSF、少量 Benzonase),混匀,放置冰上 30 min 使蛋白充分溶解;4℃, 16000 r/min 离心 15 min,上清即为双向电泳样品。采用 Bradford 法测定样品蛋白质浓度^[9]。

1.3 双向电泳

IPGphor 第一向等电聚焦电泳主要是依据 1998 年 Amersham Pharmacia Biotech 公司操作手册进行,并参照 Gorg 的方法^[10]进行一些改进。取 1.2~1.5 mg 制备的苏云金芽胞杆菌菌体蛋白样品,并加入适量的样品水化液(7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS、65 mmol/L DTT、0.2% IPG 缓冲液 pH 4~7、0.1% 溴酚蓝)充分混匀至总体积为 350 μ L。等点聚焦程序:重泡胀 2 h, 30 V 10 h, 200 V 1 h, 500 V 1 h, 1000 V 1 h, 8000 V 13 h 至等电聚焦完成。

第一向电泳后胶条的平衡:分别于 10 mL 胶条平衡缓冲液 I (6 mol/L 尿素、2% SDS、0.375 mol/L pH 8.8 Tris-HCl、30%甘油、2% DTT) 平衡 15 min,然后于胶条平衡缓冲液 II (6 mol/L 尿素、2% SDS、0.375 mol/L pH 8.8 Tris-HCl、30%甘油、2.5% 碘乙酰胺)中平衡 15 min,用去离子水冲洗干净。

第二向 SDS-PAGE 胶浓度 10% SDS-PAGE 采用恒流方式电泳。电泳结束后采用考马斯亮蓝染色^[11]。

1.4 图像扫描与分析

染色完成的双向电泳凝胶经 Imagescanner 扫描仪以及 Labscan 扫描软件扫描凝胶获取图像,透射扫描,光学分辨率为 300 dpi。采用 PDQuest 2-DE 软件分析比较 3 种菌株蛋白质双向电泳图谱的差异,选取表达水平相差 2 倍以上的蛋白点进行比较分析。

1.5 胶内酶切及 MALDI-TOF-TOF 质谱检测

胶内酶切的方法参见文献^[12]。质谱检测由湖北大学完成。

1.6 数据库查询

登陆互联网(<http://www.matrixscience.com>),用 Mascot 程序在相应数据库中对 MALDI-TOF-TOF 质谱检测得到的肽质量指纹图谱进行检索。网上检索采用 NCBI 数据库,在华大基因本地运行 Mascot 检索时选择苏云金芽胞杆菌菌株 YBT1520 基因组数据。

2 结果和分析

2.1 高产苏云金素 CT-43 和 CT-43-1C 菌株与不产苏云金素的菌株 BMB0806 蛋白表达差异

本实验获得高产苏云金素的苏云金芽胞杆菌野生型菌株 CT-43 及其突变菌株 CT-43-1C 与不产苏云金素的苏云金芽胞杆菌突变菌株 BMB0806 的双向电泳图谱(图 1),经过软件分析总共获得 29 个差异显著的点。

2.2 差异表达蛋白的质谱鉴定

选取 13 个高产苏云金素菌株与不产苏云金素菌株差异显著的点进行质谱鉴定与数据库查询,如果 $P < 0.05$,则认为得到阳性鉴定,否则视为未得到鉴定。最后获得 9 个差异蛋白点(表 1)。其中 3 个蛋白在不产苏云金素的菌株 BMB0806 中缺失,这些蛋白包括两个碳代谢途径中的蛋白(dihydroxyacetone kinase 和 N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase),一个可能与能量代谢和磷代谢相关的蛋白 PhoH protein。还有 3 个蛋白在菌株 BMB0806 中表达量降低,包括一个分泌途径相关的蛋白 UvrB/UvrC protein(AAA AT-Pase, central region:Clp, N terminal)以及 leucyl-tRNA synthetase 和 synthetase Stage IV sporulation protein A。而另外 3 个蛋白如 trigger factor、hypothetical Cytosolic Protein 和 Aconitate hydratase 在不产苏云金素的突变菌株 BMB0806 中表达量反而提高了。

3 讨论

leucyl-tRNA synthetase 和蛋白质的起始合成相关,而该蛋白在菌株 BMB0806 中表达水平显著降低,揭示了该菌株在 LB 培养基中培养至 24 h 时,菌体内的生理代谢非常缓慢,最终可能影响到苏云金素的合成。N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase 和 dihydroxyacetone kinase 这两个酶在菌株 BMB0806 中不表达, dihydroxyacetone kinase 在代谢途径中可以提供大量的能量,另外参与的氧化还原反应可能为苏云金素的合成提供了能量和相关底物; N-acetylglu

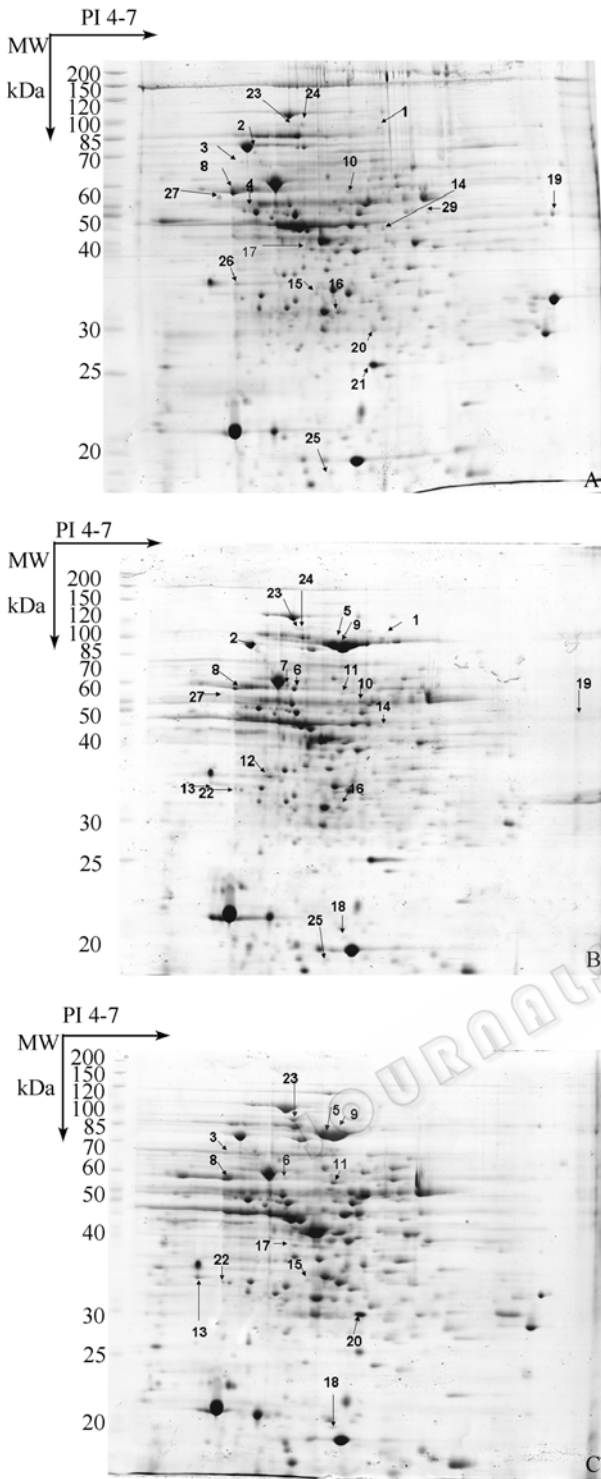


图 1 苏云金芽胞杆菌 CT-43, CT-4-1C 与 BMB0806 差异表达蛋白的双向电泳考马斯亮蓝 G-250 图谱
 Fig. 1 Differential spots in 2-D PAGE map of *Bacillus thuringiensis* CT-43, CT-43-1C and BMB0806 stained with coomassie brilliant blue G-250. Arrows indicates the 29 differentia protein spots analysed by PDQuest 2-DE. Protein Marker was at the end of pH4. A: *Bacillus thuringiensis* strain CT-43; B: strain CT-43-1C; C: strain BMB0806.

cosamine-6-phosphate deacetylase 这是一个氨基糖代谢中的一个关键的酶。有文献报道^[13, 14], 这个酶对于细菌脂多糖的合成和细菌细胞壁胞壁质氨基糖的再生具有关键作用, 而且对于某些药物还具有免疫功能。它还参与了三羧酸循环, 王志等^[15]研究报道三羧酸循环可以促进苏云金素产物的合成。推测这个蛋白对于菌体的生长代谢具有重要作用, 有可能是苏云金芽胞杆菌自身对苏云金素的免疫的重要作用因子, 但它对于苏云金素的合成以及菌体自身免疫作用还需进一步研究验证。而 Aconitate hydratase 1 在不产苏云金素的菌株 BMB0806 中表达量反而提高了, 它是柠檬酸循环中的一个重要酶, 其主要作用是将柠檬酸转变为异柠檬酸。王志等^[15]研究生物合成苏云金素代谢调控时, 通过添加不同的基础底物检测苏云金素的得率, 发现苏云金素产量提高时, 柠檬酸的含量也提高了。我们这个结果也从侧面证实了这一结论, 当柠檬酸循环降低时, 糖酵解途径和戊糖磷酸途径增加, 从而导致苏云金素产量增加。

本研究还鉴定了一个和分泌途径相关的蛋白 UvrB/UvrC protein, 在 UvrB/UvrC protein 中含有 AAA ATPase 这一区域, AAA ATPase 是 IV 型分泌途径中的膜蛋白, 分布在细胞膜上, 和其他蛋白组成一个 transporter, 利用 ATP, 可以进行能量的转化, 还起到了分泌细胞内一些特定物质(如大分子物质、毒素分子等)的作用。该蛋白在菌株 BMB0806 中表达量明显降低, 推测该蛋白可能和苏云金素的分泌相关。还鉴定一个和磷代谢相关的蛋白 phoH protein, 该蛋白在高产苏云金素的菌株中大量表达, 而在不产苏云金素的菌株 BMB0806 中不表达。目前报道该蛋白是由于磷饥饿诱导产生的, 具有 ATPase 活性和转运功能, 参与很多代谢途径, 可以将细胞外的磷通过细胞膜通道转运进细胞内^[16, 17]。苏云金素在合成途径中需要大量的磷, 尤其是代谢中间物的合成。推测它跟合成苏云金素的含磷代谢中间产物的合成及分泌相关。

苏云金素合成和代谢途径的相关研究进展缓慢与其复杂性直接相关, 蛋白质组学可以直接针对合成和代谢途径相关蛋白进行分析, 简化了研究思路。本研究通过这种方法找到了 6 个可能与苏云金素的合成和分泌相关蛋白, 为苏云金素合成基因簇的克隆和合成途径的验证提供了有力的证据, 但还需要从基因水平对其功能进行进一步验证。

表 1 苏云金芽胞杆菌 CT-43 及 CT-43-1C 与 BMB0806 的差异蛋白的质谱分析

Table 1 Database searching result and related information of interesting spots of *Bacillus thuringiensis* CT-43 and CT-43-1C with BMB0806

No.	NCBI GI Identifier	Common name	Change of protein contents *	Function
1	gi 89208529	UvrB/UvrC protein	↓	Nucleotide-excision repair, Chaperone
4	gi 42736630	Stage IV sporulation protein A	↓	sporulation metabolism
8	gi 30022561	trigger factor	↑	chaperone
13	gi 30020822	Cytosolic Protein	↑	cellular processes
14	gi 75761297	PhoH protein	-	metabolism and Phosphotransferase system
19	gi 30264131	N-acetylglucosamine -6-phosphate deacetylase	-	Aminosugars metabolism
23	gi 89208420	Aconitate hydratase 1	↑	TCA cycle
24	gi 30022810	leucyl-tRNA synthetase	↓	protein synthesis
25	gi 30313440	dihydroxyacetone kinase	-	Glycerolipid metabolism

* , Protein increase (↑), decrease (↓) and absence (-) between thuringiensin non-production strain BMB0806 and wild strain CT-43, high-production strain CT-43-1C.

参 考 文 献

- [1] 喻子牛. 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社, 1990.
- [2] Espinasse S, Gohar M, Lereclus D, *et al.* An ABC transporter from *Bacillus thuringiensis* is essential for beta-exotoxin 1 production. *J Bacteriology*, 2002, 184(21): 5848–5854.
- [3] Espinasse S, Gohar M, Lereclus D, *et al.* An extracytoplasmic-function sigma factor is involved in a pathway controlling beta-exotoxin 1 production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain 407-1. *J Bacteriology*, 2004, 186(10): 3108–3116.
- [4] 张剑冰, 欧广东. 苏云金杆菌 CT-43 菌株质粒与 ICPs 及苏云金素产生的关系研究. 华中农业大学学报(*J Huazhong Agric*), 1993, 12(6): 579–584.
- [5] Ozawa K, Iwahana H. Involvement of a transmissible plasmid in heat-stable exotoxin and delta-endotoxin in *Bacillus thuringiensis* subspecies *darmsi*. *Curr Microbio*, 1986, 13: 337–340.
- [6] Levinson BL, Kasyan KJ, Chiu SS, *et al.* Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *J Bacteriology*, 1990, 172(6): 3172–3179.
- [7] 孙明, 喻子牛. 苏云金芽胞杆菌中华亚种 CT-43 菌株伴胞晶体蛋白的特性. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 1996, 36(4): 303–306.
- [8] 董纯明, 阮丽芳, 孙明, 等. 苏云金芽胞杆菌苏云金素缺失突变菌株的筛选及特性研究. 应用与环境生物学报(*Chin J Appl Environ Biol*), 2007, 13(4): 526–529.
- [9] Bollag D, Edelman S. Protein Methods. 2nd ed. New York: Wiley Liss, Inc, 1996, 50: 50–55.
- [10] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, *et al.* The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 2000, 21(6): 1037–1053.
- [11] 江南, 吴开力. 一种简便的考马斯亮蓝 G250 蛋白质染色方法. 生物化学与生物物理进展(*Progress in Biochemistry and Biophysics*), 2000, 27(5): 560–561.
- [12] Moxon R, Rappuoli R. Bacterial pathogen genomics and vaccines. *Br Med Bull*, 2002, 62: 45–48.
- [13] Park J T. Identification of a Dedicated Recycling Pathway for Anhydro-N-Acetylmuramic Acid and N-Acetylglucosamine Derived from *Escherichia coli* Cell Wall Murein. *J Bacteriology*, 2001, 183: 3842–3847.
- [14] Ronning DR, Klabunde T, Besra GS, *et al.* Crystal structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for mycobacterial drug and vaccines. *Nat. Struct. Biol.* 2000, 7: 141–146.
- [15] Wang Z, Chen S, Sun M, *et al.* A fundamental dual regulatory role of citrate on the biosyntheses of thuringiensin and poly-beta-hydroxybutyrate in *Bacillus thuringiensis* YBT-032. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(5): 779–84.
- [16] S K Kim, K Makino, M Amemura, *et al.* Molecular analysis of the phoH gene, belonging to the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriology*, 1993, 175(5): 1316–1324.
- [17] Alexei EK, Olga V, Mikhail SG, *et al.* Bioinformatics classification and functional analysis of PhoH homologs. *In Silico Biology*, 2003, 3(1-2): 3–15.
- [18] Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*, 2002, 2: 3–10.

Differential expression protein between the thuringiensin-yield *Bacillus thuringiensis* strain CT-43 and its mutants

Chengliang Guo, Zhenfei Hu, Xiaoyan Liu, Ziquan Yu, Lifang Ruan, Ming Sun*, Ziniu Yu*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, National Engineering Research Center for Microbial Pesticides, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this research is trying to uncover the biosynthetic or metabolic relative protein of thuringiensin by proteomics. [Methods] We conducted differential expression analysis between the high thuringiensin-yield *Bacillus thuringiensis* strain CT-43 and its mutants, high production strain CT-43-1C and non-production strain BMB0806, based on the 2-D gel. Then through mass spectrum (MS) identification and bio-informatics we analyzed the detected proteins. [Results] Thirteen spots were selected to be detected by the MS, and nine of them were identified. Among them, six proteins including in the basal metabolism pathway were possibly deduced that relative with the synthesis or metabolism of thuringiensin production. [Conclusion] There were six proteins found to be connected with the influential role protein of biosynthesis and metabolic of thuringiensin production by comparative proteomics. This research provides the evidence of thuringiensin gene cluster cloning and biosynthetic analysis.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Thuringiensin; Proteomics; Differential protein

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400003)

*Corresponding author. Tel: +86-27-87283455; Fax: +86-27-87280670; E-mail: yz41@mail.hzau.edu.cn; m98sun@mail.hzau.edu.cn

Received: 24 January 2008/ Revised: 2 April 2008

1953 年创刊以来的全部论文数据库制作完成

2008 年 1 月已制作完成《微生物学报》自 1953 年创刊以来的所有文章数据库、并已经全文上网！读者可以在本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>)的首页上检索到任意一篇文章，并可以免费浏览下载全文！

建立全文数据库的工作起始于 2007 年春，由于年代久远，很多版本已成孤本，搜集整理及制作工作耗时半年多。全文数据库的建立提高了期刊的显示度，能够更好地为科研人员提供信息服务。

另，全文数据库已制作成 DVD 光盘，全部内容容纳在一张盘中。欢迎大学、研究所等图书馆和个人购买！有意购买者可直接联系中国科学院微生物研究所联合编辑部。每盘售价：100 元；联系电话：010-64807521；联系人：韩力。

期刊统计表

(2008 年 7 月统计)

年代	刊期	卷号	期号
1953-1956	半年刊	1-4	1-2
1957-1958	季刊	5-6	1-4
1959	季刊	7	1-2
1959-1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3-4
1963-1965	季刊	9-11	1-4
1966	季刊	12	1-2
1966-1972	停刊 6 年半		
1973-1988	季刊	13-28	1-4
1989-2007	双月刊	29-47	1-6
2008	月刊	48	7